

همسانه سازی، بهینه سازی شرایط بیان و تخلیص دمین کاتالیتیکی توکسین آدنیلات سیکلاز بوردتلا پرتوسیس از یک سویه بومی ایران

هانیه هاشمی جزه^۱، فهیمه باغبانی آرانی^۲، فرزاد بادمستی^۳، فرشته شاهچراغی^{۳*}

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران؛ ^۲گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران؛ ^۳گروه باکتری شناسی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۴

چکیده:

زمینه و هدف: توکسین آدنیلات سیکلاز (Adenylate cyclase Toxin= ACT) یکی از فاکتور های ویروالانس ترشحی و ایمونوزنیک بوردتلا پرتوسیس است که دارای یک دمین کاتالیزوری با ۴۰۰ اسید آمینه، به نام AC، در ناحیه N-ترمینال خود می باشد. این دمین با تحریک غیر قابل بازگشت cAMP در سلول یوکاریوت نقش مهمی در ایجاد بیماری سیاه سرفه ایفا می کند و به عنوان یک ابزار زیست شناسی سلولی بوده و در داروهای ضد سرطانی نیز مورد استفاده قرار گرفته است؛ لذا هدف از این مطالعه، دستیابی به بیان بالایی از ناحیه AC به منظور بررسی خواص آنتی ژنیک آن در جهت استفاده از آن در واکسن، ادجونت و یا تهیه ی کیت های تشخیصی می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، قطعه AC، توسط واکنش PCR تکثیر و در وکتور pET28a کلون و در باکتری *E.coli* BL21(DE3) بیان و پس از بهینه سازی شرایط بیان، آنالیز پروتئین توسط ژل SDS PAGE و وسترن بلات انجام و سپس تخلیص آن بر روی ستون کروماتوگرافی (NI-NTA) صورت پذیرفت.

یافته ها: قطعه AC با موفقیت در وکتور بیانی pET28a کلون شده و تحت سیستم بیانی القا شونده توسط IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مولار، پس از ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه می تواند قابلیت حداکثر بیان با بازدهی ۲۵ میلی گرم بر لیتر و خلوص ۹۵٪ را داشته باشد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد با القای تنها ۰/۵ میلی مولار IPTG، می توان بیان بالای دمین کاتالیزوری پرتوتین ACT، با حداکثر میزان خلوص را دارا بود که این میزان برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب است.

واژه های کلیدی: همسانه سازی، بهینه سازی بیان، دمین کاتالیتیکی آدنیلات سیکلاز، بوردتلا پرتوسیس.

مقدمه:

در جمعیت های متراکم یک بیماری اندمیک و با یک سیکل ۳-۵ سال به صورت اپیدمیک نیز می باشد؛ همچنین با وجود اینکه سیاه سرفه جز بیماری های قابل پیشگیری با واکسن می باشد، طی گزارشات سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۳، ۱۷ میلیون مورد ابتلا به سیاه سرفه در سراسر جهان گزارش گردیده که از این تعداد ۲۷۹۰۰۰ مورد آن باعث مرگ و میر شده است (۵،۴).

سیاه سرفه (Pertussis, Whooping cough) یک بیماری منحصراً تنفسی است که عامل آن یک کوکوباسیل، گرم منفی، هوازی، غیر تخمیری، بدون اسپور به نام بوردتلا پرتوسیس (*Bordetella pertussis*) می باشد (۲،۱). این باکتری در سال ۱۹۰۶، توسط بوردت و ژانکو شناسایی شد و انسان تنها میزبان طبیعی آن است (۳). این بیماری در تمام جهان منتشر شده که

*نویسنده مسئول: تهران- مرکز تحقیقات میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران- گروه باکتری شناسی- تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۰۵۵۳۵

E-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com

همچنین بیماری های دیگر مطرح شده است (۱۵). از طرفی بر اساس گزارشات ارائه شده از مرکز مدیریت بیماری ها در ایران آمار میزان بیماری با وجود پوشش واکسیناسیون، حدود ۹۹٪ در سال های اخیر افزایش یافته که می تواند ناشی از بی کیفیتی واکسن ها یا وجود سوش های پلی مورفیس باشد (۱۶).

از این رو، همان طور که در بالا اشاره شد، به دلیل نقش دمن کاتالیتیکی آدنیلات سیکلاز در بیماری زایی و نقش کاربردی آن در پزشکی، در سال های اخیر توجه دانشمندان را جهت مطالعه این ناحیه و کلونینگ و بیان آن به خود جلب کرده است (۱۷، ۱۸)، ولی تاکنون گزارشی مبنی بر بهینه سازی شرایط بیان این دمن در ایران و سایر کشورها صورت نگرفته است. تنها شرایط تولید پرتوسیس توکسین نوترکیب که از دیگر فاکتورهای ویروالانس و حائز اهمیت بوردتلا پرتوسیس می باشد، جهت استفاده در واکسن آسلولار سیاه سرفه، در ایران بهینه سازی شده است (۱۹)، لذا هدف از انجام این مطالعه استخراج قطعه AC ژن ACT از یک سویه ی بومی ایران و کلون آن در وکتور مناسب و بهینه سازی بیان در باکتری به منظور دسترسی به حداکثر بیان، جهت استفاده از آن در طرح های وسیع تری، همچون بررسی خواص آنتی ژنیک آن در جهت تولید واکسن، بررسی اثر آن به عنوان ادجونت و یا تهیه ی کیت های تشخیصی می باشد. اهمیت این موضوع زمانی مشخص تر می شود که یادآور شویم تهیه واکسن بر علیه سویه ی بومی این میکروارگانیسم به خاطر تنوع ژنتیکی این سویه در مناطق مختلف، دارای کارایی بالاتر در جمعیت ایرانی خواهد بود.

روش بررسی:

این تحقیق یک مطالعه تجربی می باشد. ابتدا جهت کشت باکتری و استخراج DNA کروموزومی، سویه شایع بوردتلا پرتوسیس در ایران که پس از نمونه گیری از نازوفارنکس بیماران مشکوک به سیاه سرفه تهیه شد و با رنگ آمیزی و کشت و سپس آزمایشات

یکی از فاکتورهای ویروالانس ضروری و حائز اهمیت بوردتلا پرتوسیس، توکسین آدنیلات سیکلاز (ACT) است که اولین بار توسط Eaton و Confer به عنوان سم ترشحی این باکتری شناخته شد (۶). این توکسین با وزن مولکولی ۲۰۰KDa، دارای یک زنجیره ی پلی پپتیدی ۱۷۰۶ آمینو اسیدی است که متشکل از یک ناحیه کاتالیزوری به نام AC، با ۴۰۰ آمینو اسید در قسمت N- ترمینال و یک ناحیه ی مشخص همولیزین RTX با ۱۳۰۶ آمینو اسید در قسمت C- ترمینال می باشد که ورود بخش کاتالیزوری به داخل سلول را تسهیل می کند (۷). ناحیه ی کاتالیزوری خود شامل ۲ بخش است: بخش ۱۸ KDa، شامل اسید آمینه ۲۲۴-۱ و مسئول افزایش cAMP سلول و یک بخش ۲۵ KDa، شامل اسید آمینه ۳۹۹-۲۲۵ که مسئول اتصال به کالمدولین سلول میزبان می باشد. این ناحیه پس از اتصال به کالمدولین که برای فعالیتش ضروری است، با فعالیت آنزیمی خود باعث تبدیل غیر قابل بازگشت ATP به cAMP می شود (۸، ۲)؛ همچنین این پروتئین باعث مهار فاگوسیتوز با واسطه کمپلمان شده و از این رو نقش مهمی در ایجاد بیماری سیاه سرفه دارد (۹). ACT، به دلیل القای آپوپتوزیس که با فعالیت دمن AC صورت می گیرد، نقش کاربردی مهمی در افزایش اثرات آپوپتوتیک داروهای ضد سرطانی مختلف دارد (۱۰-۱۲). این دمن می تواند به عنوان یک ابزار زیست شناسی سلولی نیز مورد استفاده قرار بگیرد، به این ترتیب که با فیوژ شدن به پروتئین های دیگر می تواند باعث انتقال پروتئین از باکتری به سلول های یوکاریوت شده و به عنوان یک گزارشگر انتخابی ایفای نقش کند (۱۳). ACT پروتئینی ایمونوژنیک است و به دلیل داشتن این ویژگی اخیراً به عنوان یکی از اجزای واکسن درمانی سرویکال، در درمان تومورهای واژن مورد استفاده قرار گرفته و در فاز اول راست آزمایی بالینی می باشد (۱۴)؛ همچنین به دلیل خواص ادجوتنی بالا اخیراً استفاده از این فاکتور، به عنوان کاندید در ساخت واکسن آسلولار سیاه سرفه و

تکمیلی از قبیل سیترات، حرکت، اوره و در نهایت آگلوتیناسیون توسط آنتی سرم های بوردتلا پرتوسیس در انستیتو پاستور ایران تأیید شد، انتخاب گردید و از ذخیره باکتری در محیط گلیسرولی در محیط رگان لو (Difco) کشت داده شد (۱۶). محیط به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید (در تمام مراحل سویه بوردتلا پرتوسیس (*B.pertussis* ATCC 9797) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب شناسی به عنوان سویه کنترل مثبت در نظر گرفته شد)؛ سپس به منظور لیز باکتری، سوسپانسیون آن در بافر (Phosphate-buffered saline = PBS) تهیه و در مجاورت لیزوزیم و پروتیناز K قرار گرفت. پس از اتمام این مرحله باکتری لیز و با استفاده از کیت استخراج

DNA (Roche, Germany)، طبق پرتکل DNA باکتری استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA مورد نظر با استفاده از الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ و با اندازه گیری چگالی نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد (۲۰). با توجه به توالی مربوط به ناحیه آنزیمی (N-terminal)، موجود در بانک ژنی (National Center for Biotechnology Information = NCBI) و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفرماتیکی Bcepred, Emboss Antigenic و ABCpred فاصله نوکلئوتیدی ۱ تا ۱۲۰۰ به عنوان دمن دارای فعالیت آنزیمی تأیید گردید. در نهایت با نرم افزار CLC main work bench، پرایمرهای رفت و برگشت (شرکت تکاپو زیست، ایران) طراحی شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

پرایمر	نوع	جایگاه آنزیم محدودکننده
Primer Forward	ATACATATGCAGCAATCGCATCAGGC	دارای جایگاه برش آنزیم محدود کننده <i>NdeI</i>
Primer Reverse	ATGAAAGCTTATCCTGGCGTTCCTACTGCG	دارای جایگاه برش آنزیم محدود کننده <i>HindIII</i>

پس از استخراج DNA واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حضور آنزیم *pfiu* (Fermentas, Lithuania) به منظور تکثیر ژن مورد نظر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. سپس کل محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ بار گذاری و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید، باند مورد نظر از روی ژل بریده و طبق دستورالعمل کیت استخراج از ژل (Roche, Germany) خالص سازی گردید. پس از آن محصول PCR خالص شده با آنزیم *Taq* پلیمرز (Fermentas, Lithuania) در حضور dATP به مدت ۲۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از دنباله دار شدن در وکتور pTG19-T vector (Sinaclon) همسانه سازی شد. سازه نوترکیب در باکتری *E.coli DH5α* (انستیتو پاستور ایران) ترانسفورم گردید

و پس از کشت در حضور X-gal و آمپی سیلین (Sigma, USA) کلنی های سفید رنگ انتخاب و حضور سازه نوترکیب pTG19-AC به کمک، PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت؛ سپس جهت زیر همسانه سازی ژن AC در وکتوریانی pET28a، ابتدا قطعه مورد نظر توسط آنزیم های *HindIII* (Fermentas, Lithuania)، *NdeI* (Fermentas, Lithuania)، از سازه نوترکیب pTG19-AC جداسازی و در وکتوریانی pET28a (Novagen, USA) که توسط ۲ آنزیم فوق الذکر برش داده شده بود، در حضور آنزیم T4 زیر همسانه سازی شد و سازه نوترکیب pET28a-AC حاصل گردید. این سازه در میزبان بیانی *E.coli BL21 (DE3)* (انستیتو پاستور ایران) ترانسفورم و کلنی های نوترکیب پس

با HPR (Coat anti mous IgG/HRP) با رقت ۱/۱۰۰۰ قرار گرفت و پس از شستشو با TBST با شرایط ذکر شده، کاغذ مزبور تا زمان مشاهده باند در مجاورت با سوبسترای DAB (3,3'-diaminobenzidine) قرار گرفت.

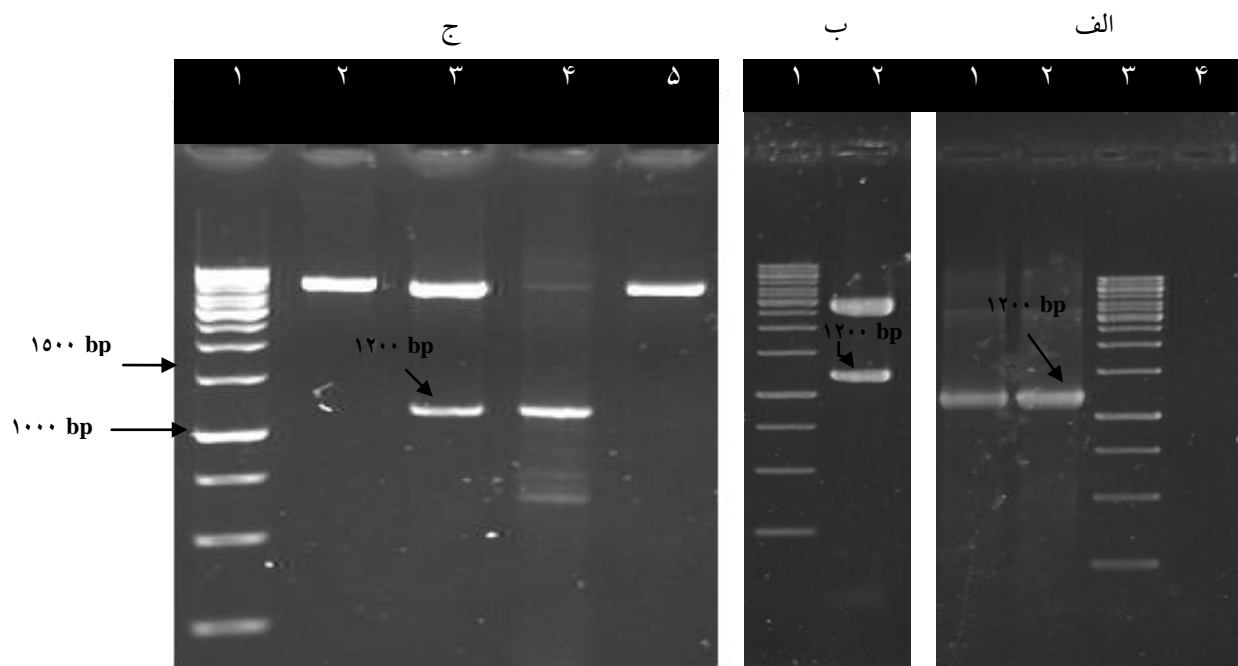
پس از دسترسی به بهترین شرایط بیانی پروتئین نو ترکیب و تأیید آن بر روی ژل SDS PAGE و آنالیز وسترن بلات، تولید پروتئین در مقیاس ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت، جهت تخلیص، صورت پذیرفت. برای تخلیص پروتئین با توجه به وجود دنباله هیستیدینی از روش واسرشت شدن بر روی ستون کروماتوگرافی تمایلی با رزین Ni-NTA بر اساس شیب PH اوره طبق دستورالعمل شرکت سازنده (کیازن) استفاده گردید. غلظت پروتئین نو ترکیب حاصل با روش برادفورد اندازه گیری و کیفیت آن بر روی ژل SDS PAGE ۱۲٪ مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

یافته ها:

پس از استخراج DNA کروموزومی بوردتلا پرتوسیس، تکثیر ژن ناحیه کاتالیتیکی ACT، به نام AC، از طریق واکنش PCR با آنزیم *pfu* در مناسب ترین دمای اتصال پرایمرها به ژن مورد نظر (۶۵ درجه سانتی گراد) صورت گرفت. نتیجه PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ در تصویر شماره ۱- الف آمده است. پس از آن محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA از روی ژل جداسازی شد و پس از دنباله دار شدن در وکتور pTG19/T همساز سازی گردید. وکتور نو ترکیب pTG 19/T-AC حاصل توسط هضم آنزیمی با ۲ آنزیم *HindIII* و *Nde1* مورد تأیید قرار گرفت (تصویر شماره ۱- ب)؛ سپس قطعه مورد نظر از روی ژل تخلیص و در وکتور pET28a زیر همساز سازی گردید. وکتور نو ترکیب pET28a-AC حاصل با موفقیت در باکتری (*Ecoli.BL21(DE3)* ترانسفورم و پس از آن با تعیین توالی، روش کلنی PCR و هضم آنزیمی توسط ۲ آنزیم ذکر شده مورد تأیید قرار گرفت (تصویر شماره ۱- ج).

از کشت در حضور کانامایسین (Sigma, USA) توسط PCR، هضم آنزیمی و تعیین سکانس مورد تأیید قرار گرفت. پس از آن به منظور بیان پروتئین و القای بهینه سازی، ابتدا کلنی حاوی سازه نو ترکیب pET28a-AC در ۵ میلی لیتر از محیط LB پراش (Difco) حاوی کانامایسین پس از یک شب انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد؛ سپس از این محیط تازه به میزان ۱/۱۰۰ رقیق شد و به دنبال انکوباسیون و رسیدن به جذب نوری (OD) برابر با ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، از محلول (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside= IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار، جهت القای پروتئین مورد نظر به محیط افزوده شد و پس از ۳ ساعت انکوباسیون با شرایط قبل، جهت بررسی بیان پروتئین روی ژل ۱۲٪ سدیم دو دسیل سولفات پلی اکریل امید (SDS PAGE) الکتروفورز گردید. در مورد نمونه کنترل منفی، شرایط کشت کاملاً به صورت گفته شده در بالا انجام شد و تنها مرحله القا با IPTG به طور کامل حذف گردید. به منظور بهینه سازی بیان پروتئین نو ترکیب پارامترهایی چون نوع کلنی، غلظت IPTG، دمای رشد و مدت زمان القا بررسی شدند تا بهترین شرایط بیان از لحاظ تجربی تعیین گردند.

به منظور تأیید پروتئین نو ترکیب تولید شده از روش وسترن بلا تینگ استفاده شد. به این ترتیب که پس از الکتروفور پروتئین بر روی ژل SDS PAGE ۱۲٪، باندهای پروتئینی به کاغذ (Polyvinylidene difluoride= PVDF) منتقل گردید و پس از بلوکه کردن جایگاه های غیر اختصاصی با Skimmed Milk (Sigma, USA) به مدت یک ساعت و پس از آن ۳ بار شستشو با TBS-T (NaCl ۱۵ میلی مولار، Tris-HCL ۱۰ میلی مولار، Tween 20 ۰/۱٪، در ۷/۴ PH)، کاغذ PVDF در مجاورت آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی (Anti his tag) قرار گرفت و دوباره توسط BS-T ۳ بار شستشو صورت پذیرفت. پس از آن به مدت ۲ ساعت کاغذ PVDF در مجاورت آنتی بادی ثانویه کونژگه شده



تصویر شماره ۱: استراتژی کلونینگ ناحیه AC

الف) تکثیر ژن AC به روش PCR: ستون ۱: نمونه کنترل مثبت سویه بوردتلا پرتوسیس *B. pertussis* ATCC 9797 (تهیه شده از بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران)، ستون ۲: ژن تکثیر یافته AC در ۱۲۰۰ bp، ستون ۳: نشانگر ۱ kb (Fermentas) ستون ۴: کنترل منفی؛ ب) هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pTG19/T-AC توسط آنزیم های *HindIII* و *NdeI* ستون ۱: نشانگر ۱ Kb، ستون ۲: وکتور نوترکیب pTG19/T-AC برش یافته توسط *HindIII* و *NdeI* (ج) هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET28a-AC توسط آنزیم های *HindIII* و *NdeI* ستون ۱: نشانگر ۱ Kb، ستون ۲: وکتور نوترکیب pET28a-AC ستون ۳: وکتور نوترکیب برش یافته با *HindIII* و *NdeI* ستون ۴: کلنی PCR از وکتور نوترکیب pET28a-AC، ستون ۵: وکتور pET28a برش خورده با *HindIII* و *NdeI*

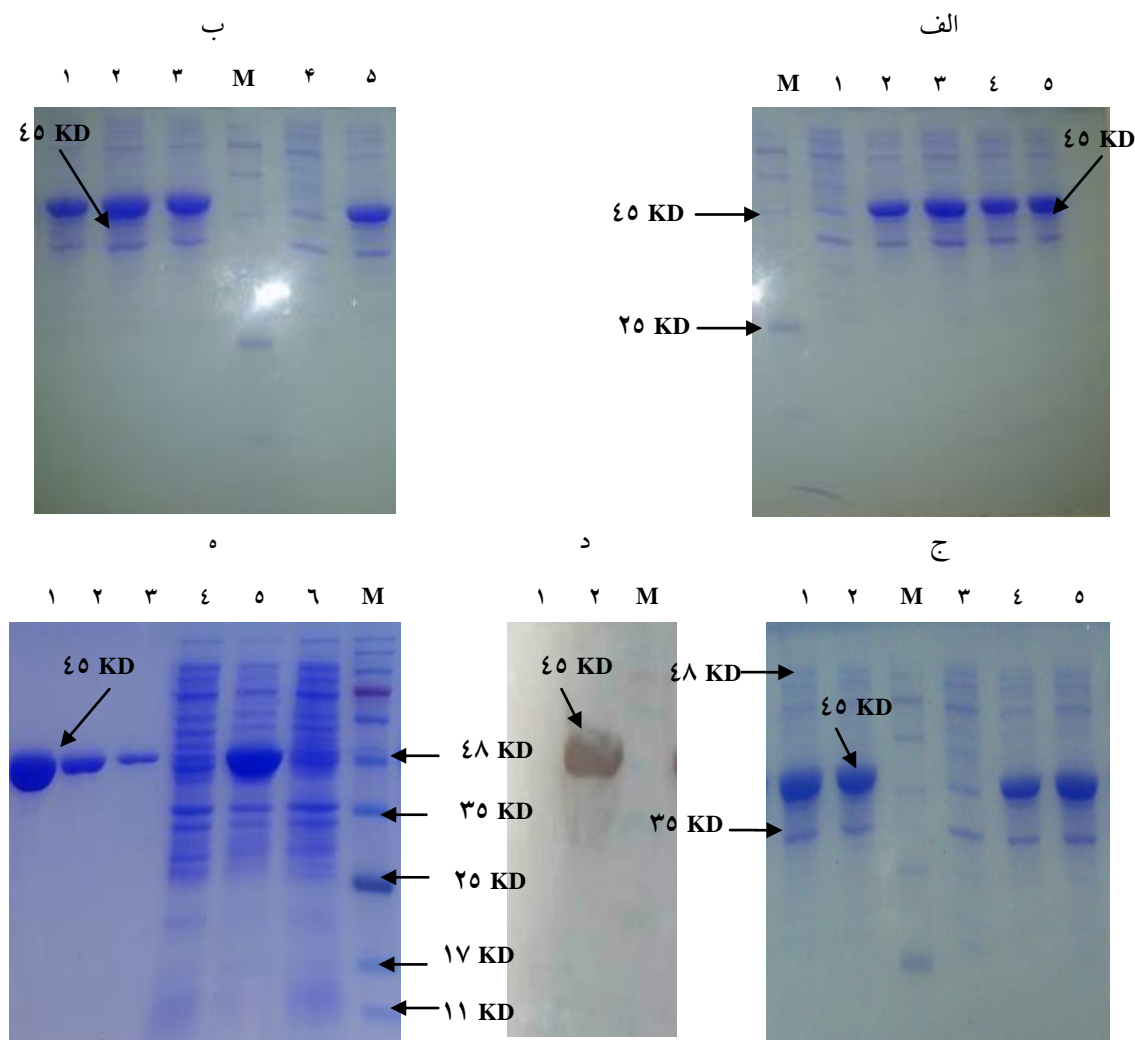
نمایانگر آن بود که بیان پروتئین پس از رسیدن رشد باکتری به جذب نوری ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر با القای ۰/۵ میلی مولار IPTG و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت به حداکثر میزان خود می رسد. این نتایج در آنالیز وسترن بلات نیز مورد تأیید قرار گرفت (تصویر شماره ۲-د).

پروتئین نوترکیب به دلیل وجود دنباله هیستیدینی با روش کروماتوگرافی تمایلی با Ni-NTA بر اساس شیب PH اوره تخلیص گردید (۱۵). همان طور که در (تصویر شماره ۲-ه) مشاهده می شود، تخلیص این پروتئین (دانستومتری ژل SDS PAGE software Lab works) در یک مرحله تا حدود ۹۵٪ ممکن می باشد که این میزان تخلیص برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب

به منظور بهینه سازی شرایط بیان نیز، کلنی انتخابی که دارای بیان بیش تری بود، در محیط کشت LB مایع در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد و پس از رسیدن به رشد کافی به منظور دسترسی به بهترین بیان غلظت های مختلف IPTG (۰/۲، ۰/۵، ۰/۸ و ۱ میلی مولار) القا و بر روی ژل SDS PAGE ۱۲٪ مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۲-الف) که مشخص شد، بهترین غلظت ۰/۵ میلی مولار بوده است. حال در مرحله بعد، از بهینه سازی کلونی مورد نظر با غلظت بهینه ۰/۵ میلی مولار، در زمان های مختلف (۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت) نیز مورد بررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۲-ب)؛ سپس کلنی در دماهای مختلف، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ۳۸ درجه سانتی گراد بررسی شد (تصویر شماره ۲-ج). این نتایج

استفاده از این سیستم امکان پروتئین تخلیص شده به میزان ۲۵ میلی گرم بر لیتر وجود دارد.

است. اندازه گیری های انجام شده به روش اندازه گیری در OD280 و کیت پروتئین سنجی، نمایانگر آن است که با



تصویر شماره ۲: آنالیز بیان و تخلیص پروتئین AC توسط SDS PAGE و وسترن بلات

الف) بهینه سازی شرایط بیان (بررسی غلظت های مختلف IPTG)؛ ستون M: نشانگر پروتئینی (Fermentas)، ستون ۱: نمونه قبل از القا، ستون ۲، ۳، ۴، ۵: نمونه های بعد از القای IPTG به ترتیب در غلظت های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۸ و ۱ میلی مولار؛ ب) بهینه سازی شرایط بیان (بررسی زمان های مختلف پس از القای IPTG)؛ ستون ۱: نمونه ۳ ساعت پس از القا، ستون ۲: نمونه ۴ ساعت پس از القا، ستون ۳: نمونه ۵ ساعت پس از القا، ستون M: نشانگر پروتئینی (Fermentas)، ستون ۴: نمونه قبل از القا، ستون ۵: نمونه ۲ ساعت پس از القا؛ ج) بهینه سازی شرایط بیان (بررسی زمان های مختلف القا IPTG)؛ ستون ۱: القا در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد، ستون ۲: القا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ستون M: مارکر پروتئینی، ستون ۳: نمونه قبل از القا، ستون ۴: القا در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، ستون ۵: القا در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد؛ د) آنالیز وسترن بلات؛ ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: پروتئین نوترکیب، ستون M: مارکر پروتئینی؛ ه) تخلیص پروتئین نوترکیب؛ ستون ۱: پروتئین نوترکیب تخلیص شده، ستون ۲: شستشوی پروتئین در PH: ۵/۹، ستون ۳: شستشوی پروتئین در PH: ۶/۳، ستون ۴: Super flow، ستون ۵: نمونه بعد از القا، ستون ۶: نمونه قبل از القا، ستون M: نشانگر پروتئینی (Fermentas).

بحث:

ACT از جمله فاکتورهای ویروالانس حائز اهمیت *بوردتلا پرتوسیس*، در ناحیه N- ترمینال خود دارای دمین کاتالیزوری با ۴۰۰ اسید آمینه، به نام AC می باشد که با فعالیت آنزیمی و تبدیل غیر قابل بازگشت ATP به cAMP و نیز مهار فاگوسیتوز ماکروفاژها نقش مهمی در ایجاد بیماری سیاه سرفه دارد (۹،۸،۷). این ناحیه نقش کاربردی مهمی نیز در افزایش اثرات آپوپتوتیک داروهای ضد سرطانی داشته و می تواند با انتقال پروتئین از باکتری به سلول های یوکاریوت به عنوان یک گزارشگر انتخابی ایفای نقش کند (۱۳-۱۰). از طرفی با توجه به این که اپیتوپ های CD⁴⁺ و CD⁸⁺، T-cell به طور ژنتیکی درون دمین AC قرار گرفته و نیز طبق مقاله ای توسط Weingart و همکاران مبنی بر وجود آنتی بادی های 3D1 و 5D1 علیه این دمین، می توان تصور کرد که دمین AC به دلیل داشتن خواص ایمونوژنیک می تواند در تهیه واکسن، آنتی بادی های مونوکلونال و نیز کیت های تشخیصی بر پایه الایزا، مورد استفاده قرار گیرد (۲۱،۲۲)، لذا با توجه به اینکه *بوردتلا پرتوسیس* بومی مناطق مختلف جغرافیایی هتروژن می باشند، تهیه واکسن و کیت تشخیصی بر اساس بومی بودن باکتری اهمیت پیدا کرده که این خود توجیهی برای کلونینگ، بیان و تخلیص این پروتئین از سویه بومی در ایران می باشد. کما اینکه با وجود پوشش واکسیناسیون علیه سیاه سرفه تلفات ناشی از این باکتری را شاهد می باشیم که یکی از دلایل آن می تواند به علت بومی نبودن واکسن در ایران باشد.

با توجه به مطالب اشاره شده، دمین AC توسط Vougier و همکاران و Johann و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت (۱۷،۱۸). این مطالعه بر روی اسید آمینه ۱ تا ۳۸۴ و بر روی اسید آمینه ۱ تا ۴۸۹ صورت گرفت. در هر دوی این مطالعات جهت تولید پروتئین نوترکیب از وکتور pTR و میزبان *E.coliBLR* جهت

بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید. در این مطالعات نیز مانند مطالعه ما، پس از رسیدن OD 600 باکتری به ۰/۶، بیان AC در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت و پس از تخلیص پروتئین به دست آمده، درجه خلوصی برابر با ۹۵٪ را نشان داد.

طبق بررسی های ما، مطالعه بر روی کل پروتئین ACT نسبتاً بسیار گسترده می باشد و از گذشته تا حال به منظور بررسی خواص گوناگون آن، بیان پروتئین نوترکیب ACT در اکثر موارد درون سویه های مختلف *E.coli* صورت گرفته است و تنها در یک مورد خاص درون باکتریوفاژ M13 و در موردی دیگر درون باکتری *بوردتلا پرتوسیس* گزارش شده است (۲۶-۲۳)، ولی تاکنون مطالعه ای در جهت بهینه سازی شرایط بیان دمین کاتالیتیک AC، به منظور دسترسی به میزان بالای پروتئین صورت نگرفته است. بدین منظور، در مطالعه ما، پس از شناسایی خواص آنزیمی این ناحیه با روش های بیوانفرماتیک، از وکتور pET28a که بیان ژن را تحت کنترل پروموتور T7 انجام می دهد، به عنوان وکتور بیانی با بهره وری بسیار بالا استفاده شد؛ همچنین در مطالعه ای بر روی ۱۰۰ KD از پروتئین ACT، از وکتور بیانی pET15b که دارای پروموتور T7 می باشد، تولید پروتئین به میزان ۲۰ میلی گرم در یک لیتر محیط کشت به دست آمد (۲۷). در این مطالعه نیز همانند مطالعه حاضر از میزبان بیانی *E.coli BL21(DE3)* استفاده شد که بیان بالای پروتئین به مقدار ذکر شده دلیل محکمی بر کارآمد بودن این سویه می باشد. غلظت IPTG القا شده در این مطالعه که بر روی ۱۰۰ KD از پروتئین ACT انجام شده بود، ۱ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می باشد که ما با بهینه سازی شرایط بیان، این غلظت را به ۰/۵ میلی مولار رساندیم و بازدهی تولید پروتئین را به میزان ۲۵ میلی گرم بر لیتر افزایش دادیم. اهمیت این موضوع در تولید انبوه و صنعتی پروتئین خود را به خوبی نشان

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر، با استفاده از وکتور بیانی pET28a و میزبان بیانی *E.coli* BL21(DE3) و القای تنها ۰/۵ میلی مولار، IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت، پس از رسیدن OD600 باکتری به ۰/۶، به میزان ۲۵ میلی گرم بر لیتر پروتئین نوترکیب AC با میزان خلوص ۹۵٪ را تولید کرد. پروتئین نوترکیب حاصل هیچ گونه جهشی نداشته و به راحتی توسط Anti his tag مورد شناسایی قرار گرفته است، لذا این پروتئین با چنین میزان تخلیص برای اکثر کاربردهای تحقیقی و تشخیصی مناسب است.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل قسمتی از طرح انستیتو پاستور ایران با کد ۱۵۷۷ می باشد که در تاریخ ۹۲/۱۱/۱۵ تصویب شده است، لذا بدینوسیله از این مرکز پژوهشی به دلیل حمایت های مالی و کلیه همکاران بخش میکروب شناسی که ما را در این پژوهش همکاری کرده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

می دهد، چرا که مصرف کم تر IPTG (که قیمت نسبتاً بالایی دارد) باعث کاهش هزینه های تولید می گردد. لازم به ذکر است که مطالعه دیگری در ایران جهت کلون و بیان آنتی ژن دیگری از بوردتلا پرتوسیسی انجام گرفته است (۱۹). این فاکتور ویرو لانس که ساب یونیت S1 توکسین پرتوسیسی می باشد، جهت بهینه سازی در وکتورهای بیانی pET22b و pAED4 کلون گردید که در ادامه نشان دادند، از وکتور pET22b که دارای پروموتور T7 می باشد، نسبت به وکتور pAED4 می توان انتظار بیان بیش تری از پروتئین را داشت. در این مطالعه نیز همانند ما از میزبان بیانی *E.col* BL21(DE3) جهت بهینه سازی بیان استفاده شده است که نشان دهنده کارآمد بودن این سویه *E.coli* در تولید حداکثر میزان پروتئین می باشد، اما در مطالعه ذکر شده ساب یونیت S1 توکسین پرتوسیسی از سویه استاندارد بوردتلا پرتوسیسی استخراج و مورد مطالعه قرار گرفته است، در حالی که در مطالعه ما همان طور که دلایل آن نیز ذکر شده است، از سویه بومی بوردتلا پرتوسیسی استفاده شده است که این خود دلیل محکمی بر ویژگی مطلوب این تحقیق می باشد.

منابع:

1. Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1989; 57(7): 2223-9.
2. Babu, M M, Bhargavi J, Singh Saund, R Kumar Singh S. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Curr Res Sci*. 2001; 80(12): 1512-22.
3. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(2): 326-82.
4. Wood N, McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev*. 2008; 9(3): 201-11.
5. Rieber N, Graf A, Hartl D, Urschel S, Belohradsky BH, Liese J. Acellular pertussis booster in adolescents induces Th1 and memory CD8+ T cell immune response. *PloS one*. 2011; 6(3): e17271.
6. Confer DL, Eaton JW. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*. 1982; 217(4563): 948-50.
7. Veneziano R, Rossi C, Chenal A, Devoisselle JM, Ladant D, Chopineau J. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(51): 20473-8.
8. Sebo P, Osicka R, Masin J. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014; 13(10): 1215-27.

9. Kamanova J, Kofronova O, Masin J, Genth H, Vojtova J, Linhartova I, et al. Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol.* 2008; 181(8): 5587-97.
10. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: More than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol.* 2006; 59(2): 447-59.
11. Johansson D, Bergstrom P, Henriksson R, Grankvist K, Johansson A, Behnam-Motlagh P. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* enhances cisplatin-induced apoptosis to lung cancer cells in vitro. *Oncol Res.* 2006; 15(9): 423-30.
12. Cheung GY, Kelly SM, Jess TJ, Prior S, Price NC, Parton R, et al. Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *J Microb Pathog.* 2009; 46 (1): 36-42.
13. Geddes K, Worley M, Niemann G, Heffron F. Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 2005; 73(10): 6260-71.
14. Sebo P, Osicka R, Masin J. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2014; 13(10): 1215-27.
15. Cheung GY, Xing D, Prior S, Corbel MJ, Parton R, Coote JG. Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect Immun.* 2006; 74(12): 6797-805.
16. Shahcheraghi F, Lotfi M, Parzadeh M, Nikbin V, Shouraj F, Zahraei. Isolation of *Bordetella Pertussis* and *Bordetella Parapertussis* of Clinical Specimens from Different Provinces of Iran. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2012; 22(88): 2-8.
17. Vouquier S, Mary J, Dautin N, Vinh J, Friguet B, Ladant D. Essential role of methionine residues in calmodulin binding to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase, as probed by selective oxidation and repair by the peptide methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30210-8.
18. Karst JC, Barker R, Devi U, Swann MJ, Davi M, Roser SJ, et al. Identification of a Region That Assists Membrane Insertion and Translocation of the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *J Biol Chem.* 2012; 287(12): 9200-12.
19. Khafri A, Aghaiypour K, Peerayeh SN, Ghorbani R. Cloning and Expression of S1 Subunit of Pertussis Toxin in *Escherichia coli*. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2011; 3(1): 19-24.
20. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982; 76-85.
21. Fayolle C, Bauche C, Ladant D, Leclerc C. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase delivers chemically coupled CD8+ T-cell epitopes to dendritic cells and elicits CTL *in vivo*. *Vaccine.* 2004; 23 (5): 604-14.
22. Weingart CL, Mobberley-Schuman PS, Hewlett EL, Gray MC, Weiss AA. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun.* 2000; 68(12): 7152-5.
23. Fayolle C, Osickova A, Osicka R, Henry T, Rojas MJ, Saron MF, et al. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol.* 2001; 75(16): 7330-8.
24. Dadaglio G, Morel S, Bauche C, Moukrim Z, Lemonnier FA, Van Den Eynde BJ, et al. Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes. *Int Immunol.* 2003; 15(12): 1423-30.
25. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1988; 7(12): 3997-4004.
26. Brownlie RM, Coote JG, Parton R, Schultz JE, Rogel A, Hanski E. Cloning of the adenylate cyclase genetic determinant of *Bordetella pertussis* and its expression in *Escherichia coli* and *B. pertussis*. *Microb Pathog.* 1988; 4(5): 335-44.
27. Pojanapotha P, Thamwiriya N, Powthongchinn B, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. *Bordetella pertussis* CyaA-RTX subdomain requires calcium ions for structural stability against proteolytic degradation. *Protein Expr Purif.* 2011; 75(2): 127-32.

Cloning and optimization of expression and purification of the catalytic domain of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* from an Iranian strain

Hashemi H¹, Baghbani-Arani F², Badmasti F³, Shahcheraghi F^{3*}

¹Microbiology Dept., Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I.R. Iran;

²Genetics and Biotechnology Dept., Varamin-pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I.R. Iran; ³Bacteriology Dept., Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. Iran.

Received: 12/Mar/2015 Accepted: 26/Sep/2015

Background and aims: Adenylate cyclase toxin is one of the immunogenic virulence factors secreted by *Bordetella pertussis*, that consists of catalytic domain corresponding to the 400 N-terminal residues called AC. This domain can stimulate cAMP synthesis in eukaryotic cells, and it has an important role in development of pertussis. It also can be used as a cell biology tool and in anti-cancer drugs. The aim of this study was to achieve high expression of the antigenic properties of the AC to evaluate its use in vaccines, adjuvant or the provision of diagnostic kits.

Methods: In this experimental study, AC domain amplified by PCR reaction, and cloned into pET28a vector and expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) host. After the optimization of expression, protein analysis by SDS PAGE gel and Western blot analysis were performed. Purification was carried out on column chromatography (NI-NTA).

Results: AC fragment was cloned successfully into a pET28a vector and under expression system with a concentration of 0.5 mM IPTG induction after 4 hours at 37 °C, AC can be expressed as a function of maximum yields 25mg/L and 95% purity.

Conclusion: This study showed that the induction of expression using only 0.5 mM IPTG can result in the over expression of the catalytic domain of protein ACT with maximum purity. This amount is appropriate for many applications, including research and diagnosis.

Key words: Cloning, Expression optimization, Adenylate cyclase catalytic domain, *Bordetella pertussis*.

Cite this article as: Hashemi H, Baghbani-Arani F, Badmasti F, Shahcheraghi F. Cloning and optimization of expression and purification of the catalytic domain of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* from an Iranian strain. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(1): 63-72.

***Corresponding author:**

Research Center of Pasteur Institute of Iran, Microbiology Dept., Tehran, I.R. Iran.
Tel: 00982166405535, E-mail: shahcheraghifereshteh@yahoo.com